

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Terpadu II Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

4.2 Alat Penelitian

4.2.1 Uji Golongan Senyawa Fitokimia

1. Beaker gelas 100 ml Pyrex
2. Hotplat
3. Kain flanel
5. Corong
6. Tabung reaksi
7. Timbangan *analytical balance* (Scout Pro 400g)
8. Pipet tetes
9. Gelas ukur 5ml dan 10 ml
10. Kiesel Gel 254

4.2.2 Preparasi Sampel

1. Kertas saring Whattman
2. *Juicer*
3. Beaker gelas

4.2.3 Pengujian Antioksidan dengan ABTS

1. Labu ukur 10,0 ml , 25,0 ml dan 50,0 ml Pyrex *Iwaki*
2. Beaker gelas 100 ml Pyrex
3. Mikropipet 100 μ l
4. Pipet tetes
5. Timbangan *analytical balance* (Scout Pro 400g)
6. Tisu

7. Alumunium foil
8. Sendok tanduk
9. Batang pengaduk
10. Spektrofotometer UV-Vis (UV mini-1240 *Shimadzu*)
11. Kuvet *Hellma Analytics*
12. Pipet volume 0,5 ; 1,0 ; 2,0; 4,0; 5,0 ml
13. Pipet ukur 10 ml
14. Gelas ukur 10 ml; 25 ml Pyrex
15. Piknometer

4.3 Bahan Penelitian

4.3.1 Uji Fitokimia

1. Buah Apel Manalagi
2. Olahan Sari Apel
3. Aquadest
4. HCl pekat
5. Serbuk Magnesium
6. FeCl_3
7. Gelatin
8. NaCl 10%
9. H_2SO_4 10%
10. Kloroform
11. Aseton
12. Asam formiat
13. Etil asetat
14. n-heksan
15. Etanol
16. Butanol

4.3.2 Preparasi Sampel

1. Buah apel Manalagi segar.
2. Olahan sari apel Manalagi

4.3.3 Pengujian antioksidan dengan ABTS

1. Aquadest
2. Etanol
3. ABTS (2,2-Azinobis(3- etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat) TCI
4. Vitamin C *Pharmaceutical grade*
5. Olahan Sari Apel Manalagi
6. Buah Apel Manalagi
7. Kalium persulfat ($K_2S_2O_8$) Sigma Aldrich

4.4 Rancangan Penelitian

4.4.1 Design Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan buah apel segar Manalagi dan olahan sari apel Manalagi dengan metode ABTS. Tahapan kegiatan yang akan dilakukan meliputi preparasi sampel, penapisan fitokimia dan pengujian aktivitas antioksidan.

4.4.2 Variabel Penelitian

4.4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah buah apel Manalagi dan produk olahan sari apel Manalagi. Konsentrasi larutan uji yang digunakan pada buah apel Manalagi yaitu 125, 625, 6.250, 15.625, 18.700, 25.000, 31.250, 62.500, dan 125.000 ppm. Sedangkan, pada produk olahan sari apel Manalagi konsentrasi yang digunakan yaitu 12.875, 25.750, 51.500, 103.000, 206.000, 412.000, 824.000 dan 1.030.000 ppm.

4.4.2.2 Variabel Tergantung

Sebagai variabel tergantung pada penelitian ini adalah absorbansi dari larutan uji buah apel Manalagi dan produk olahan sari apel Manalagi dengan larutan kontrol positif.

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Preparasi Sampel

Untuk sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu larutan sari apel Manalagi dan buah apel Manalagi segar. Buah apel Manalagi segar ditimbang 50 gram kemudian di *juicer* lalu disaring dengan kain flanel sehingga dihasilkan filtrat buah apel segar.

4.5.2 Penapisan Fitokimia Buah Apel

4.5.2.1 Uji Polifenol

a. Preparasi Sampel

Sebanyak 5 ml sari buah apel Manalagi dan larutan apel Manalagi segar ditambahkan 10 ml aquades panas, diaduk, lalu ditambahkan 3-4 tetes 10% NaCl, kemudian diaduk. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian, masing-masing ± 5 ml dan disebut sebagai larutan IV A, IV B dan IV C.

b. Uji Gelatin

Larutan IV A digunakan sebagai blanko, larutan IV B ditambah dengan sedikit larutan gelatin dan 5 ml larutan NaCl 10%. Jika terjadi endapan putih menunjukkan adanya tannin

c. Uji Ferri Klorida

Sebagai larutan IV C diberi beberapa tetes larutan FeCl_3 , kemudian amati terjadinya perubahan warna. Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin. Jika pada penambahan gelatin dan NaCl tidak timbul endapan putih, tetapi setelah ditambahkan dengan larutan FeCl_3 terjadi perubahan warna menjadi hijau biru hingga hitam, menunjukkan adanya senyawa polifenol.

d. Kromatografi Lapis Tipis

Larutan IV C digunakan untuk pemeriksaan dengan KLT. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan :

Fase diam : Kiesel Gel 254

Fase gerak : kloroform-etil asetat-asam formiat (0,5 : 9 : 0,5) dalam 20 ml

Penampak noda: pereaksi FeCl_3 . Adanya polifenol ditunjukkan dengan timbulnya warna hitam.

4.5.2.2 Uji Flavonoid

a. Preparasi Sampel

Sebanyak 5 ml sari buah apel Manalagi dan larutan apel Manalagi segar dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok dengan 3 ml n-heksan berkali-kali dalam tabung reaksi sampai ekstrak tidak berwarna. Residu dilarutkan dalam 20 ml etanol dan dibagi menjadi 4 bagian, masing-masing disebut larutan IIIA, IIIB, IIIC dan IIID

b. Reaksi Warna

1. Uji Bate-Smith dan Metcalf

Larutan IIIA digunakan sebagai blanko, larutan IIIB ditambahkan 0,5 ml HCL pekat dan diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian panaskan di atas penangas air dan diamati lagi perubahan warna yang terjadi. Bila perlahan-lahan menjadi warna merah terang atau ungu menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin (dibandingkan dengan blanko).

2. Uji Wilster

Larutan IIIA digunakan sebagai blanko, larutan IIIC ditambahkan 0,5 ml HCl pekat dan serbuk magnesium. Diamati perubahan warna, diencerkan dengan 2 ml air suling, ditambah 1 ml butanol. Diamati warna yang terjadi di setiap lapisan. Perubahan warna jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol, merah tua menunjukkan adanya flavanon.

c. Kromatografi Lapis Tipis

Larutan IIID ditotolkan pada fase diam. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan :

Fase diam : Kiesel Gel 254

Fase gerak : Kloroform:aseton:asam formiat (7ml:7 ml:2 tetes)

Penampak noda : Asam sulfat 10%

Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif.

4.5.3 Persiapan Pembuatan Larutan Uji Aktivitas Antioksidan

4.5.3.1 Pembuatan Larutan Pereaksi ABTS

Membuat larutan ABTS 7 mM dengan menimbang 8 mg ABTS dilarutkan dalam 1 ml aquadest. Membuat larutan kalsium persulfat 2,45 mM dengan

menimbang 13,2 mg kalsium persulfat dilarutkan dalam 10 ml air. Kemudian larutan dicampur dalam ruang gelap selama 12- 16 jam. Larutan ABTS dilarutkan dengan aquadest dan etanol (1:1) hingga absorbansinya $0,700 \pm 0,05$ pada panjang gelombang 734 nm (Wangcharoen and Morasuk, 2008).

4.5.3.2 Pembuatan Larutan Blanko (L.B).

Larutan blanko yang digunakan adalah aquadest dan etanol dengan perbandingan 1:1 untuk penentuan panjang gelombang maksimal.

4.5.3.3 Pengukuran Waktu Inkubasi

Pengukuran waktu inkubasi ditentukan dengan *operating time* yang merupakan waktu yang dibutuhkan untuk bereaksi dengan senyawa lain, sehingga terbentuk senyawa yang stabil. Waktu yang digunakan mulai menit ke-2 sampai ke menit ke-65 setelah penambahan pereaksi ABTS.

4.5.3.4 Pembuatan Larutan Sari Apel Sebagai Larutan Uji (L.U SA).

Pembuatan larutan baku induk sari apel dibuat dengan konsentrasi, yaitu di pipet 20,0 ml sari apel sehingga di dapat konsentrasi (1.030.000 ppm) sebagai larutan baku induk (LBI). Sari apel di uji dalam beberapa seri konsentrasi yaitu 12.875, 25.750, 51.500, 103.000, 206.000, 412.000, 824.000 dan 1.030.000 ppm, dimana pada larutan uji ini dilakukan pengukuran sebanyak tiga kali replikasi.

Pembuatan larutan uji :

- L.U SA 1 : Dibuat konsentrasi 12.875 ppm dengan dipipet 5,0 ml L.U SA 2 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0ml larutan pereaksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U SA 2 : Dibuat konsentrasi 25.750 ppm dengan dipipet 5,0 ml L.U SA 3 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.

- L.U SA 3 : Dibuat konsentrasi 51.500 ppm dengan dipipet 5,0 ml L.U SA 4 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U SA 4 : Dibuat konsentrasi 103.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml L.U SA 5 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U SA 5 : Dibuat konsentrasi 206.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml L.U SA 6 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U SA 6 : Dibuat konsentrasi 412.000 ppm dengan dipipet 5,0 ml L.U SA 7 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U SA 7 : Dibuat konsentrasi 824.000 ppm dengan dipipet 20,0 ml sari apel masukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 25,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.

4.5.3.5 Pembuatan Larutan Buah Apel Manalagi Sebagai Larutan Uji

Manalagi (L.U M).

Pembuatan larutan baku induk apel Manalagi dibuat dengan konsentrasi , yaitu 1,0 ml larutan apel Manalagi kemudian dilarutkan dalam aquadest sampai 10,0 ml pada labu ukur dan dikocok hingga larut di dapat konsentrasi (125.000 ppm) sebagai larutan baku induk (LBI). Larutan Apel Manalagi di uji dalam

beberapa konsentrasi yaitu 125, 625, 6.250, 15.625, 18.750, 25.000, 31.250 dan 62.500 ppm, dimana pada larutan uji ini dilakukan pengukuran sebanyak tiga kali replikasi.

Pembuatan larutan uji :

- L.U M 1 : Dibuat konsentrasi 125 ppm dengan dipipet 2,0 ml L.U M 2 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U M 2 : Dibuat konsentrasi 625 ppm dengan dipipet 1,0 ml L.U M 3 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U M 3 : Dibuat konsentrasi 6.250 ppm dengan dipipet 1,0 ml L.U M 8 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U M 4 : Dibuat konsentrasi 15.625 ppm dengan dipipet 5,0 ml L.U M 7 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U M 5 : Dibuat konsentrasi 18.750 ppm dengan dipipet 3,0 ml L.U M 8 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- L.U M 6 : Dibuat konsentrasi 25.000 ppm dengan dipipet 1,0 ml L.U M 8 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan

ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.

L.U M 7 : Dibuat konsentrasi 31.250 ppm dengan dipipet 5,0 ml L.U M 8 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.

L.U M 8 : Dibuat konsentrasi 62.500 ppm dengan dipipet 5,0 ml LBI masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.

4.5.3.6 Pembuatan Larutan Vitamin C Sebagai Kontrol Positif (K.P)

Pada penelitian ini menggunakan vitamin C sebagai kontrol positif dengan berbagai konsentrasi yaitu ditimbang 50 mg Vitamin C dan dilarutkan dengan aquadest sampai 50,0 ml pada labu ukur dan dikocok hingga larut di dapat konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan baku induk 1 (LBI 1). Kemudian, dipipet 3,0 ml LBI 1 dimasukkan labu ukur 10,0 ml sehingga di dapatkan konsentrasi 300 ppm sebagai larutan baku induk 2 (LBI 2). Konsentrasi vitamin C yang digunakan yaitu 0,3, 3, 15, 30, 60, 90, 120 ppm, dimana pada larutan uji ini dilakukan pengukuran sebanyak tiga kali replikasi.

Pembuatan larutan uji :

K.P 1 : Dibuat konsentrasi 0,3 ppm dengan dipipet 1,0 ml K.P 2 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.

K.P 2 : Dibuat konsentrasi 3 ppm dengan dipipet 1,0 ml K.P 4 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan

ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.

- K.P 3 : Dibuat konsentrasi 15 ppm dengan dipipet 5,0 ml K.P 4 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- K.P 4 : Dibuat konsentrasi 30 ppm dengan dipipet 1,0 ml LBI 2 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- K.P 5 : Dibuat konsentrasi 60 ppm dengan dipipet 5,0 ml K.P 7 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- K.P 6 : Dibuat konsentrasi 90 ppm dengan dipipet 3,0 ml LBI 2 dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.
- K.P 7 : Dibuat konsentrasi 120 ppm dengan dipipet 4,0 ml LBI 2 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambah aquadest hingga 10,0 ml. Dari larutan tersebut dipipet 100 μ l dan ditambahkan 6,0 ml larutan peraksi ABTS. Diinkubasi selama 60 menit setelah penambahan larutan pereaksi.

4.5.4 Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Spektrofotometri UV-Vis

4.5.4.1 Pengukuran λ Maksimum Larutan Pereaksi ABTS

Pada pengukuran λ maks di ukur larutan pereaksi ABTS. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang

maksimum yang di dapatkan sebagai pengukuran absorpsi larutan uji, larutan kontrol positif dan larutan pereaksi ABTS.

4.5.4.3 Pengukuran Absorbansi Larutan Uji, Kontrol Positif

Larutan uji sari apel (L.U SA), larutan apel Manalagi segar (L.U M) dan kontrol positif (K.P) dengan berbagai konsentrasi di ukur nilai absorpsinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan λ maksimum yang telah ditentukan.

4.6 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif. Analisis secara deskriptif akan diketahui nilai penghambatan (IC_{50}) dari larutan uji sari apel Manalagi dan apel segar Manalagi serta kontrol positif.

4.6.1 Perhitungan Persen Penghambatan

Persen penghambatan diperoleh dari data pengukuran absorbansi sampel yaitu seri konsentrasi larutan uji dan vitamin C sebagai kontrol positif dengan absorbansi larutan blanko dengan rumus sebagai berikut

Persen penghambatan L.U SA =

$$\frac{(A \text{ larutan pereaksi ABTS} - A \text{ larutan uji sari apel Manalagi})}{(A \text{ larutan pereaksi ABTS})} \times 100\%$$

Persen penghambatan L.U M =

$$\frac{(A \text{ larutan pereaksi ABTS} - A \text{ larutan apel segar})}{(A \text{ larutan pereaksi ABTS})} \times 100\%$$

Persen penghambatan K.P =

$$\frac{(A \text{ larutan pereaksi ABTS} - A \text{ larutan vitamin C})}{(A \text{ larutan pereaksi ABTS})} \times 100\%$$

4.6.2 Perhitungan IC_{50}

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat merendam sebanyak radikal bebas ABTS. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang diperoleh dari perhitungan pada saat nilai persen penghambatan sebesar 50 dari persamaan regresi linier $y = bx + a$. Nilai dari x pada persamaan tersebut menunjukkan konsentrasi yang akan dicari atau yang diperlukan untuk

merendam 50% radikal bebas ABTS, sedangkan nilai y pada persamaan ini adalah persen penghambatan. Dari persamaan tersebut dapat dibandingkan nilai IC_{50} pada produk olahan sari apel Manalagi dengan vitamin C dan apel segar Manalagi dengan vitamin C sehingga dapat diketahui perbedaan aktivitas antioksidan pada produk olahan sari apel Manalagi dan apel segar Manalagi .

